

III. METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium agronomi dan kebun percobaan Fakultas Pertanian-Peternakan Universitas Muhammadiyah Malang pada Juli 2018 – Oktober 2018.

3.2. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu : LAF (*Laminar Air Flow*), ~~Ankroskop cahaya binokuler, sayatan bertingkat 8 mm, 100 mm, 175 μ m, dan 98 μ m,~~ pinset, *scalpel*, *hand counter*, pipet volume 5 ml, cangkul, *sprayer*, spidol permanen, alat tulis, timbangan analitik, bunsen burner, kamera, alat ukur.

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah PDA (*Potatoes Dextrose Agar*), PDB (*Potatoes Dextrose Broth*), Isolat *Trichoderma harzianum* Rifai koleksi milik Laboratorium Agronomi Fakultas Pertanian Peternakan Universitas Muhammadiyah Malang (Gambar 13), isolat *Rigidoporus* sp. diisolasi dari sampel akar tanaman kopi yang sakit di daerah Sumber Manjing Wetan Kabupaten Malang Desa Arjokuncaran. Jawa Timur, akuades, spiritus, alkohol 70%, benih jagung, beras jagung, bibit kopi arabika, *Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza* (VAM) koleksi Laboratorium Agronomi Universitas Muhammadiyah Malang, tanah, pasir zeolit, sekam, kertas karton, plastik bening tahan panas ukuran 1000 g, aluminium foil, polibag berukuran 13x13x22 cm dengan volume 3718 cm³, bak plastik berukuran 32x26x11 cm dengan volume 9152 cm³.

3.3. Rancangan Percobaan

Penelitian ini dilaksanakan dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) faktorial terdiri dari dua faktor. Melihat pada penelitian Marlina (2010) yang menyatakan pemberian *Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza* (VAM) dengan dosis 10 dan 15 gam per tanaman didapatkan hasil yang terbaik untuk menurunkan presentasi serangan penyakit *Colletotrichum capsici*, pada cabai merah, Hasil penelitian Soenartiningih, *et al.*, (2006) menyatakan pemberian cendawan mikoriza arbuskular dengan bobot inokulum sebesar 10 g propagul dengan jumlah spora 100 spora dapat menekan intensitas penyakit busuk pelepah pada tanaman jagung dengan inokulasi optimum pada 20 g propagul dengan jumlah spora sebanyak 200 spora. Metode yang digunakan mengikuti penelitian Soernatingsih *et al.*, (2006) yang dimodifikasi, sehingga menjadi pedoman untuk faktor pertama dengan pemberian Mikoriza (M) yang terdiri dari empat taraf yaitu : M0 = tanpa mikoriza, M10 = 10 g/tanaman dengan jumlah spora 50 spora , M15 = 15 g/tanaman dengan jumlah spora 100 spora dan M20 = 20 g/tanaman dengan jumlah spora 150 spora. Faktor kedua pemberian *Trichoderma harzianum* (T) dengan mengikuti metode penelitian Nurahmi, (2012) yang dimodifikasi yaitu setelah berkembang dalam media padat beras jagung dilakukan perhitungan konidia dengan kerapatan spora hingga mencapai 10^6 per ml menggunakan *haemocytometer* yang terdiri dari empat taraf yaitu T0 = Tanpa *Trichoderma*, T10 = 10 g/tanaman, T15 = 15 g/tanaman, dan T20 = 20 g/tanaman. Kombinasi dari kedua faktor menghasilkan 16 kombinasi. Penyajian perlakuan berdasarkan pengelompokan pada Tabel 4 sebagai berikut:

Tabel 4. Kombinasi Dua Faktor dan Pengelompokan Perlakuan

Dosis VAM (<i>Vesikular- Arbuskular Mycorrhiza</i>) (M)	Dosis <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (T)	Kelompok		
		I	II	III
Tanpa Mikoriza (M0)	Tanpa <i>Trichoderma</i> (T0)	T0 + M0	M0 + T0	M0 + T0
	10 g/tanaman (T10)	M0 + T10	M0 + T10	M0 + T10
	15 g/tanaman (T15)	M0 + T15	M0 + T15	M0 + T15
	20 g/tanaman (T20)	M0 + T20	M0 + T20	M0 + T20
10g/tanaman (M10)	Tanpa <i>Trichoderma</i> (T0)	M10 + T0	M10 + T0	M10 + T0
	10 g/tanaman (T10)	M10 + T10	M10 + T10	M10 + T10
	15 g/tanaman (T15)	M10 + T15	M10 + T15	M10 + T15
	20 g/tanaman (T20)	M10 + T20	M10 + T20	M10 + T20
15g/tanaman (M15)	Tanpa <i>Trichoderma</i> (T0)	M15 + T0	M15 + T0	M15 + T0
	10 g/tanaman (T10)	M15 + T10	M15 + T10	M15 + T10
	15 g/tanaman (T15)	M15 + T15	M15 + T15	M15 + T15
	20 g/tanaman (T20)	M15 + T20	M15 + T20	M15 + T20
20g/tanaman (M20)	Tanpa <i>Trichoderma</i> (T0)	M20 + T0	M20 + T0	M20 + T0
	10 g/tanaman (T10)	M20 + T10	M20 + T10	M20 + T10
	15 g/tanaman (T15)	M20 + T15	M20 + T15	M20 + T15
	20 g/tanaman (T20)	M20 + T20	M20 + T20	M20 + T20

Keterangan :

Kontrol (T0) : Tanpa *Trichoderma*

Kontrol (M0) : Tanpa Mikoriza

T10 : *Trichoderma* 10 g/Tanaman.

T15 : *Trichoderma* 15 g/Tanaman.

T20 : *Trichoderma* 20 g/Tanaman.

M10 : Mikoriza 10 g/Tanaman dengan jumlah spora lebih/kurang 50
spora

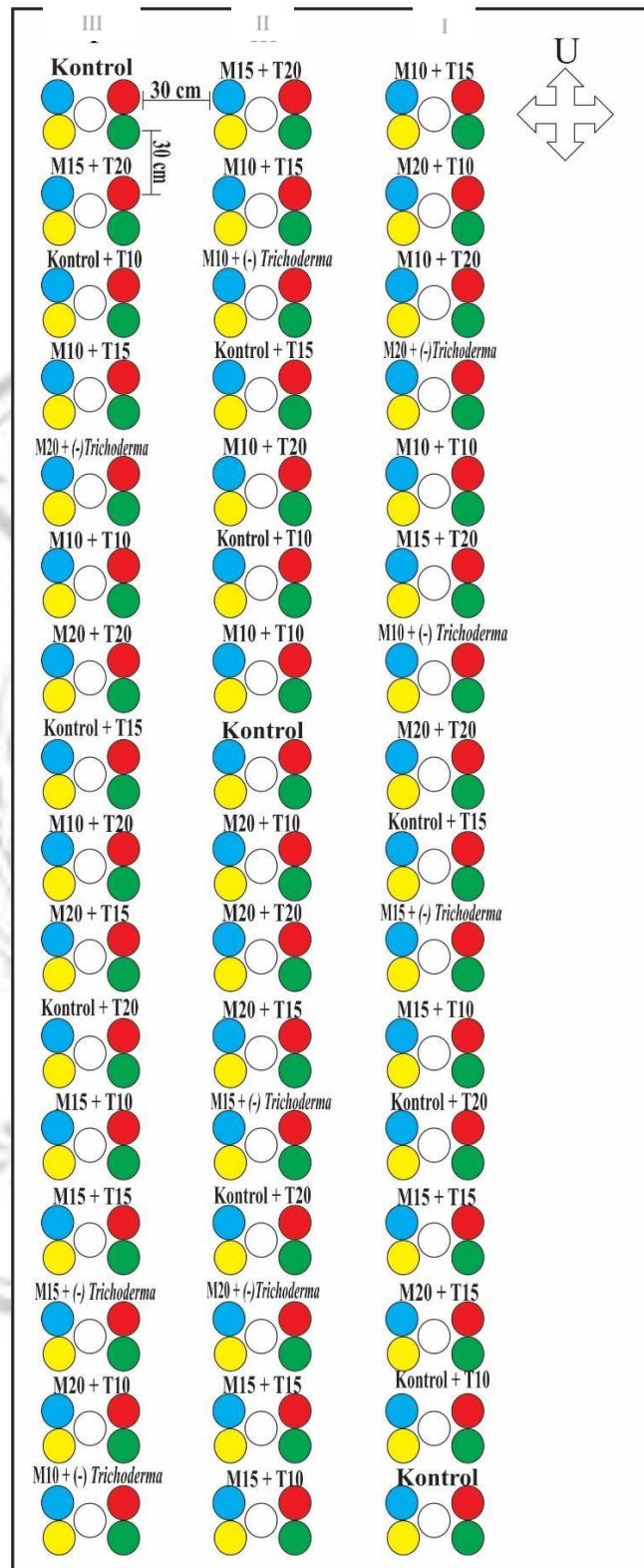
M15 : Mikoriza 15 g/Tanaman dengan jumlah spora lebih/kurang 100
spora

M20 : Mikoriza 20 g/Tanaman dengan jumlah spora lebih/kurang 150
spora

Setiap kombinasi perlakuan diberikan 4 sampel dan 1 cadangan, sehingga didapatkan 80 sampel tanaman. Kemudian diberikan pengulangan sebanyak 3 kali, total keseluruhan sampel sebanyak 240 sampel tanaman. Pengamatan secara destruktif dilakukan satu minggu sekali setelah *transplanting* dengan pengambilan satu tanaman sebagai sampel untuk mewakili perlakuan yang diberikan.

3.3.1. Denah Penelitian

Denah yang akan dilaksanakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :



Gambar 7. Denah Penelitian

Keterangan :

I : Kelompok 1

II : Kelompok 2

III : Kelompok 3

● : Sampel 1

● : Sampel 2

● : Sampel 3

● : Sampel 4

○ : Cadangan

Jarak per perlakuan : 30 cm

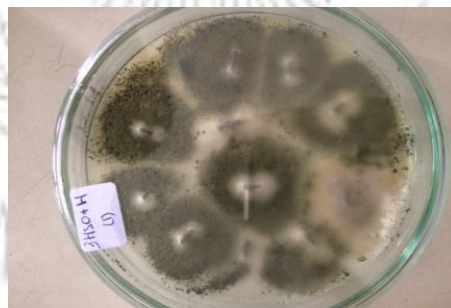
Jarak antar kelompok : 30 cm

PxL Total : 900 x 200 cm.

3.4. Pelaksanaan Penelitian

3.4.1. Perbanyakkan Fungi

3.4.1.1. *Trichoderma harzianum* Rifai



Gambar 8. Isolat *Trichoderma harzianum* Rifai koleksi Laboratorium Agronomi Universitas Muhammadiyah Malang

Trichoderma harzianum Rifai yang akan digunakan merupakan isolat koleksi Laboratorium Agronomi Universitas Muhammadiyah Malang, metode peremajaan *Trichoderma harzianum* Rifai menggunakan media PDA mengikuti metode

penelitian Yudha (2016) yang dimodifikasi 200 g kentang yang dipotong kecil yang direbus menggunakan akuades dan diambil ekstraknya, kemudian ditambahkan dextrose dan agar masing-masing sebanyak 20 g, lalu ditambahkan akuades hingga larutan bervolume 1000 ml, lalu ditambahkan 10 ml penisilin. Medium disterilkan dengan menggunakan autoklaf bersuhu 121°C selama 15 menit (Pratomo, 2006). setelah itu PDA dituangkan dalam cawan petri yang telah disterilisasi kemudian di beri isolat *Trichoderma harzianum* dan inokulasi selama tujuh hari. Dilanjutkan dengan metode perbanyakan *Trichoderma harzianum* Rifai mengikuti Gusnawaty, dkk, (2017) setelah diperbanyak di media PDA selanjutnya dilakukan perbanyakan kembali dengan menggunakan media padat beras jagung yang direndam selama 24 jam kemudian di cuci dan dikukus hingga lunak lalu dimasukkan ke dalam tabung kaca sebanyak 300 g per tabung dan ditutup selanjutnya di sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, setelah itu diberi inokulum *Trichoderma hariz anum* dalam bentuk suspensi menggunakan pipet volume sebanyak 2 ml (Gambar 14) (Ramadhani, 2006) dan diinkubasi selama 14 hari hingga membentuk koloni, setelah itu bentuk aplikasi dilakukan bersama saat *transplanting* tanaman sesuai dengan kombinasi perlakuan dan diinkubasi dalam polybag tanaman kopi selama tujuh hari.

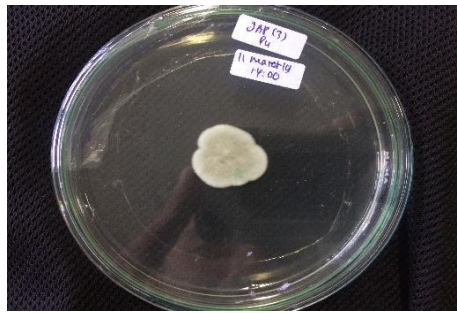
3.4.1.2. Jamur Akar Putih (*Ridoporus* sp.)



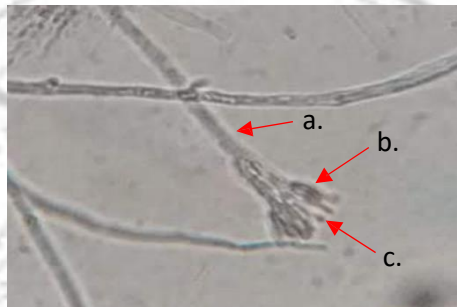
Gambar 9. Sampel Akar Tanaman Kopi.

Sumber : Sumber Manjing Wetan, Desa Arjokuncaran. Kab. Malang, Jawa Timur, Indonesia

Metode yang dilakukan mengikuti metode Sunarmi, N. (2010) sampel akar yang telah didapat dicuci menggunakan air mengalir selama 5 menit kemudian direndam dalam larutan alkohol 70% selama 5 menit, selanjutnya direndam kembali menggunakan larutan NaOCL 1% selama 5 menit. Kemudian dibilas menggunakan akuades steril dengan cara merendam sampel selama 1 menit yang diulang sebanyak 2 kali. Selanjutnya sampel akar di tiriskan diatas tisu steril dan dipotong sepanjang 2 mm kemudian diinokulasi pada media PDA selama 7 hari selanjutnya diidentifikasi (Gambar 16). Maka didapatkan jamur akar putih (*Rigidoporus* sp.) yang ditunjukkan pada Gambar 10 dan 11. Proses infeksi jamur akar putih (*Rigidoporus* sp.) dilakukan setelah inkubasi *Trichoderma* dan mikoriza di tanah dengan metode *root dip* yang merujuk pada penelitian Arwiyanto, dkk, 1994 dalam Nawangsih 2006 akar tanaman kopi dibersihkan dari tanah yang melekat kemudian direndam dalam suspensi *Rigidoporus* sp. menggunakan PDB pada kerapatan 10^7 cfu/ml selama 30 menit kemudian ditanam pada media tanah yang telah disiapkan dan telah diberi perlakuan (Gambar 17)



Gambar 10. Makroskopis Jamur Akar Putih (*Rigidoporus* sp.) Hasil Isolasi Pada Akar Tanaman Kopi



Gambar 11. Mikroskopis Perbesaran 40x Lensa Objektif a. Hifa Jamur Akar Putih (*Rigidoporus* sp.) b. Sterigma c. Basidiospora. Hasil Isolasi Pada Akar Tanaman Kopi

3.4.1.3. *Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza* (VAM)



Gambar 12. Tanah *Vesicular-Arbuskula Mycorrhiza* (VAM) Koleksi Laboratorium Agronomi Universitas Muhammadiyah Malang

Metode untuk mengembangkan VAM ini menggunakan pasir zeolit dan bibit jagung sebagai tanaman inang, hal ini mengikuti metode dalam penelitian Ambarwulan, dkk., (2003) termodifikasi, media perbanyakan mikoriza menggunakan pasir zeolit yang dicuci, setelah di cuci kemudian pasir dikeringkan

angin dan dimasukkan ke dalam bak berukuran 32x26x11 cm dengan volume 9152 cm³. kemudian benih jagung di tanam dengan lubang tanam 2-3 cm dan diberi starter mikoriza koleksi milik laboratorium agronomi fakultas pertanian peternakan universitas Muhammadiyah malang sebanyak 1 g per tanaman (Gambar 15). Kemudian pasir zeolit dilarutkan menggunakan air dengan mengikuti Pacioni (1992) dalam Irawan, E., (2014) yang dimodifikasi. Sebanyak 10, 15, dan 20 g sampel zeolit dimasukkan ke dalam beker gelas dan ditambahkan air sebanyak 100 ml kemudian di aduk hingga homogen selama 10 menit, selanjutnya larutan tersebut didiamkan selama 1 menit dengan tujuan natan dan supernatan terpisah, lalu supernatan dituangkan ke dalam saringan bertingkat 1 mm., 100 μ m, 75 μ m, dan 38 μ m. diulang sebanyak 3 kali, setiap ulangan pada saringan paling bawah dibilas menggunakan air yang diwadahi cawan petri. Kemudian pengamatan spora dilakukan menggunakan mikroskop. Bertujuan untuk mengetahui dan menyesuaikan dengan perlakuan yang diberikan. Waktu aplikasi mikoriza dilakukan bersama dengan *transplanting* tanaman dan *Trichoderma* sesuai dengan kombinasi perlakuan dan diinkubasi selama tujuh hari.

3.4.2. Persiapan Tanam

Media tanam yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanah yang dicampur dengan sekam padi bakar dengan perbandingan 1:1 sebagai asupan bahan organik dalam tanah kemudian dimasukkan ke dalam polibag berukuran 13x13x22 cm dengan volume 3718 cm³ dengan total kebutuhan polibag dan bibit sebanyak 240 buah. setelah itu, dilakukan pindah tanam tanaman kopi beserta perlakuan agen hayati yang dimasukkan ke dalam polibag tersebut dan diaduk hingga homogen.

3.4.3. Pemeliharaan

Pemeliharaan yang dilakukan pada penelitian ini yaitu dengan melakukan penyiraman tanaman 2 kali dalam satu minggu

3.4.4. Penyulaman

Penyulaman dalam penelitian ini akan dilakukan untuk tanaman yang mati sebelum pemberian jamur akar putih.

3.5. Variabel Pengamatan

Variabel pengamatan dalam penelitian ini adalah tinggi tanaman (cm), jumlah daun (helai), tingkat serangan *Rigidoporus* sp. yang bersifat sistemik atau menyeluruh yang diamati pada setiap perlakuan (%), berat segar total tanaman (g), berat kering total tanaman (g), tingkat infeksi akar *Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza* (VAM) (%) dan jumlah spora *Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza* (VAM), jumlah spora *Trichoderma harzianum* Rifai (Cfu/ml).

3.5.1. Tinggi Tanaman

Tinggi tanaman diukur menggunakan mistar dalam satuan centimeter (cm) yang dimulai dari pangkal batang tanaman yang berada di permukaan tanah hingga bagian titik tumbuh tertinggi tanaman. Pengamatan yang akan dilakukan satu minggu sekali sebanyak empat kali pengamatan.

3.5.2. Jumlah Daun

Perhitungan jumlah daun dilakukan secara manual pada daun yang telah muncul, pengamatan yang dilakukan satu minggu sekali sebanyak empat kali pengamatan dengan satuan helai.

3.5.3. Tingkat Serangan

Tingkat serangan *Rigidoporus* sp. yang bersifat menyeluruh yang diamati pada setiap perlakuan di hitung menggunakan rumus sebagai berikut (Mardatin, 2007):

$$P = \frac{a}{b} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

Keterangan

P : Tingkat serangan

a : jumlah tanaman yang sakit setiap perlakuan

b : jumlah tanaman seluruhnya setiap perlakuan

Pengamatan ini dilakukan sebanyak empat kali setiap minggu, baik sebelum diberikan inokulum penyakit hingga penelitian ini selesai yaitu pada minggu ke 4

3.5.4. Berat Segar Total Tanaman

Pengamatan berat segar total tanaman dilakukan pada minggu ke 2 sampai 4 setelah *transplanting*. Pengamatan dimulai dengan menyobek polibag kemudian media tanam digemburkan. Setelah itu akar tanaman dibersihkan menggunakan air untuk menghilangkan sisa tanah yang menempel pada akar tanaman. Tanaman yang telah diambil tersebut dilakukan penimbangan dengan menggunakan timbangan analitik dalam satuan gram (g). Bertujuan untuk mengetahui laju pertumbuhan tanaman (*Crop Growth Rate*), dengan rumus :

$$CGR = \frac{1}{Ga} \times \frac{W1-W2}{T1-T2} \dots\dots\dots (2)$$

Luas Balok :

$$\text{Luas Balok} = 2 (P.L \times P.T \times L.T) \dots\dots\dots (3)$$

Keterangan :

Ga : Luas tanah dalam polibag yang diukur dengan luas balok

W1 : Berat segar pengamatan ke - 1

W2 : Berat segar pengamatan ke - 2

T1 : Waktu pengamatan ke -1

T2 : Waktu pengamatan ke -2

P : Panjang polibag

T : Tinggi polibag

L : Lebar polibag

3.5.5. Berat Kering Total Tanaman

Pengamatan berat kering tanaman pun dilakukan pada minggu ke 2 sampai 4 setelah *transplanting*. Tanaman yang telah ditimbang berat segarnya kemudian dimasukkan ke dalam kertas karton dan di oven dengan suhu sekitar 80⁰ C, pengamatan dilakukan setiap 12 jam selama 24 jam hingga didapatkan berat konstan tanaman yang dinyatakan dalam satuan (g). Variabel pengamatan ini bertujuan untuk mengetahui pertumbuhan relatif tanaman (*Relative Growth Rate*). Rumus untuk mengetahui pertumbuhan relatif tanaman sebagai berikut :

$$RGR = \frac{\ln W_1 - \ln W_2}{T_1 - T_2} \text{ g.g}^{-1}.\text{minggu}^{-1} \dots\dots\dots (4)$$

Keterangan :

lnW1 : Berat kering tanaman waktu ke - 1

lnW2 : Berat kering tanaman waktu ke - 2

T1 : Waktu ke -1

T2 : Waktu Ke -2

3.5.6. Persentase Infeksi Akar dan Jumlah Spora *Vesicular-Arbuscular*

Mycorrhiza (VAM)

Metode yang digunakan untuk melihat tingkat infeksi mikoriza ada akar mengikuti metode Phylip dan Hyman (dalam Setiadi dan Setiawan, 2011) Sampel akar tanaman pada setiap perlakuan direndam dengan larutan KOH 10% selama 15-30 menit dan dipanaskan dengan suhu 100°C kemudian akar di cuci menggunakan air mengalir sebanyak 3-5 kali, selanjutnya direndam menggunakan larutan H₂O₂ 3% selama 10-30 menit pada suhu 90°C dan dicuci menggunakan air mengalir sebanyak 3-5 kali. Selanjutnya akar direndam dengan menggunakan larutan HCL 1% selama 30 menit, setelah itu direndam dengan menggunakan *trypan blue* dengan suhu 90°C kemudian akar dipotong 1 cm lalu diamati menggunakan mikroskop cahaya untuk mengetahui infeksi mikoriza pada akar tanaman. Selanjutnya dihitung persentase infeksi mikoriza berdasarkan rumus (Schenck, 1988 dalam Nurhidayati *et al.*, 2010) dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Infeksi akar} = \frac{\text{jumlah akar terinfeksi}}{\text{jumlah seluruh potongan akar diamati}} \times 100\% \dots$$

(5)

dan jumlah spora yang terdapat pada tanah mengikuti metode Perhitungan jumlah spora Mikoriza mengikuti metode Pacioni (1992) dalam Setiadi & Setiawan (2011) yang dimodifikasi. Sebanyak 10 g sampel tanah dimasukkan ke dalam beker gelas dan ditambahkan air sebanyak 100 ml kemudian di aduk hingga homogen selama 10 menit, selanjutnya larutan tersebut didiamkan selama 1 menit dengan tujuan natan dan supernatan berpisah, lalu supernatan dituangkan ke dalam saringan bertingkat 1 mm, 100 μ m, 75 μ m, dan 38 μ m diulang sebanyak 3 kali, setiap ulangan pada saringan paling bawah dibilas menggunakan air yang diwadahi cawan petri. Kemudian pengamatan spora dilakukan menggunakan mikroskop.

Pengamatan ini dilakukan pada saat minggu ke empat untuk setiap perlakuan yang diberikan.

3.5.7. Jumlah Spora *Trichoderma harzianum* Rifai

Pengamatan populasi *Trichoderma harzianum* dilakukan dengan mengambil sampel tanah pada setiap perlakuan yang dilakukan menggunakan metode *serial dilution plate* (Thomas, *et, al.*, 2015) di modifikasi, sampel tanah diambil dan timbang sebanyak 1 g lalu ditambahkan akuades steril 9 ml pada tabung reaksi 12 ml dan dihomogenkan, setelah homogen sampel tersebut diambil 1 ml kemudian tambahkan 9 ml akuades steril ke dalam tabung reaksi hingga 10^{-3} . selanjutnya sampel dituang pada PDA dalam cawan petri dan diinokulasi selama 3 hari. Selanjutnya hasil inokulasi dilarutkan dalam aquades steril dan diteteskan pada *haemocytometer* untuk dihitung jumlah spora dengan kerapatan 10^6 menggunakan *haemocytometer* dan mikroskop cahaya. Rumus untuk mengetahui jumlah spora *Trichoderma harzianum* menggunakan metode (Gabriel & Riyatno, 1989 dalam Herlinda, S., *et, al.*, 2006) sebagai berikut :

$$S = \frac{t \cdot d}{(n \times 0,25)} \times 10^6 \dots\dots\dots (6)$$

Keterangan :

- S : Jumlah spora
- t : Jumlah total spora dalam kotak sampel yang diamati
- d : Tingkat pengenceran
- n : Jumlah kotak sampel (5 kotak besar x 16 kotak kecil)
- 0,25 : Faktor koreksi penggunaan kotak sampel skala kecil pada *haemocytometer*.

Pengamatan ini dilakukan pada minggu ke empat untuk setiap perlakuan yang diberikan.

3.6. Analisis Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu uji F apabila hasil pengujian berpengaruh nyata maka dilanjutkan dengan uji BNJ (Beda Nyata Jujur) taraf 5%.

